

# Fatty acid modification and endothelial cell reactivity

Citation for published version (APA):

Vossen, R. C. R. M. (1993). *Fatty acid modification and endothelial cell reactivity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19930506rv>

## Document status and date:

Published: 01/01/1993

## DOI:

[10.26481/dis.19930506rv](https://doi.org/10.26481/dis.19930506rv)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

This thesis describes an *in vitro* study of the effects of fatty acid modification on endothelial cell reactivity. Both dietary lipids and endothelial cells are recognised to play a role in atherogenesis. The development of atherosclerosis is considered to be a multifactorial process in which, among others, a derailment of normal inflammatory and hemostatic processes, occurring as a response to activation of the arterial wall, are involved. Endothelial cells, because of their characteristic localisation at the interface between circulatory system and tissues may play a crucial role in those processes. A broad range of stimuli may cause endothelial cell activation, which among others results in an increase in leukocyte adherence and transport of cells across the vascular wall (chapter 1). It will be evident that any modification that influences normal endothelial cell reactivity might contribute to these phenomena. In this respect, we were interested to explore whether there exists a link between membrane fatty acid composition and endothelial cell reactivity. We, therefore, developed a model to reproducibly modify the fatty acid composition of cultured human endothelial cells in order to study its effect on a variety of endothelial functional activities, which may be important in atherogenesis.

In chapter 2 different methods to modify the fatty acid composition *in vitro* were developed. Endothelial cells (from human umbilical cord) were cultured for about 7 days in media containing either high density lipoprotein and dioleoyl phosphatidylcholine vesicles, or human serum and sodium oleate. Evaluation of the different protocols showed that the most appropriate method was long-term culturing of endothelial cells in the presence of human serum supplemented with 200  $\mu\text{M}$  of a saturated, monounsaturated or polyunsaturated fatty acid. In chapter 3 we further investigated this fatty acid modification procedure at the level of the individual phospholipid classes. In contrast to the commonly used short-term fatty acid incubations, our long-term fatty acid modification resulted in an increase of the supplemented fatty acid (and elongation products) in each phospholipid class, which was always counter balanced by adaptational changes in the levels of other fatty acids in a way suggestive of control of membrane unsaturation. We have found that long-term modification of endothelial cells with a saturated fatty acid was accompanied by an increase of arachidonic acid (20:4(n-6)) in the membrane phospholipids.

Because of the role of 20:4(n-6) in cellular communication as a substrate for bioactive mediators, the influence of endothelial cell fatty

acid modification on the incorporation, distribution and modification of 20:4(n-6) in each phospholipid class, was also studied using radiolabeled arachidonic acid (chapter 3). Our results indicated that all fatty acid modified cells appeared to economically control their 20:4(n-6) content by storing excess of 20:4(n-6) into triglycerides and elongation. Moreover, a critical 20:4(n-6) level was carefully maintained in phosphatidylinositol when 20:4(n-6) content was limited, irrespective of modifications in the other phospholipid classes.

This method of long-term fatty acid modification enabled us to study the effects of membrane fatty acid composition on several functional activities of endothelial cells. Evaluation of the results indicated that in those cases in which fatty acids contribute to creating a microenvironment for membrane-associated processes, but do not actively participate in these processes, fatty acid modification has no effect on endothelial cell reactivity. Thus, we have found no influence of membrane fatty acid modification on various general inflammatory and hemostatic processes, such as the adherence of polymorphonuclear leukocytes and monocytes to the endothelial monolayer, the ability of an endothelial monolayer to facilitate fibrin formation in recalcified human plasma (procoagulant activity) (chapter 2), hydrogen peroxide induced DNA damage (chapter 7), and the shedding of procoagulant microvesicles by complement C5b-9 stimulated endothelial cells, measured as the generation of a catalytic membrane surface that stimulates thrombin formation (prothrombinase activity) (chapter 4). This indicates that the observed control of membrane fatty acid unsaturation maintains 'homeostasis' at the level of endothelial cell reactivity, allowing normal cell functioning.

Conversely, in those cases in which fatty acids not only provide a suitable microenvironment for membrane-associated processes, but also actively participate in these processes either directly or indirectly, an effect of fatty acid modification on endothelial cell reactivity was found. When cell activation requires that membrane fatty acids are used as a substrate molecule for the formation of bioactive mediators, we have found that eicosanoid production by endothelial cells (e.g. following thrombin activation) was influenced by their membrane fatty acid composition, especially when the cells exhibited a considerable decrease in 20:4(n-6) content as a result of modification with 20:5(n-3) supplemented media (chapter 2). Furthermore, in those cases in which membrane fatty acids are target molecules for reactive oxygen intermediates formed during cellular activation, the sensitivity to peroxidation of isolated endothelial cell phospholipids was affected by their fatty acid composition (chapter 6). The sensitivity to peroxidation of an individual polyunsaturated fatty acid in peroxidized phospholipids was found to be proportional to the number of double bonds in that fatty acid. In addition, conjugated diene formation during peroxidation of isolated endothelial cell phospholipids was related to the total amount of

polyunsaturated fatty acids present. However, no unequivocal relation was found between conjugated diene formation and the unsaturation index (a measure of the average amount of double bonds in the phospholipids) (chapter 6).

An indirect participation of certain fatty acids in membrane-associated processes could be inferred from observations on the stimulated release of von Willebrand factor from the endothelial storage granules. We have shown a specific increase of PMA or thrombin induced von Willebrand factor secretion in endothelial cells modified with 20:4(n-6) (chapter 4). Since at present the influence of 20:4(n-6) on protein kinase C activity and/or eicosanoid synthesis can not be ruled out, the actual mechanism and significance of this phenomenon remains to be explored.

In summary, we have shown that relatively large modifications of fatty acid composition can be induced in endothelial cell phospholipids *in vitro*, without influencing the growth characteristics and viability of the cells. However, the overall effect of long-term fatty acid modification on endothelial cell reactivity appears to be limited by 'homeostatic' control of the membrane physico-chemical environment, allowing normal cell functioning. On the other hand, in those cases in which fatty acids are active participants in cellular activation phenomena, endothelial cell reactivity is affected.



## Samenvatting

Hart en vaatziekten vormen een van de belangrijkste doodsoorzaken in de ontwikkelde landen. Meestal ligt het proces van atherosclerose (aderverkalking) hieraan ten grondslag. Atherosclerose is een chronische aandoening van de vaatwand in arteriën, waarbij in de loop der jaren plaatselijke verdikkingen van de intima (de binnenwand) ontstaan die kunnen leiden tot vaatvernauwing. De elasticiteit van de arteriën vermindert eveneens. Tijdens de ontwikkeling van een atherosclerotische plaque (vaatwandverdikking) dringen monocytten (witte bloedcellen) vanuit het bloed de vaatwand binnen waar ze veranderen in schuimcellen door grote hoeveelheden vetten (voornamelijk cholesterolesters) op te nemen. Verder migreren gladde spiercellen naar de intima, waardoor de plaque groeit en vaatvernauwing veroorzaakt. Er zijn talrijke aanwijzingen dat voedingsvetten en endotheelcellen hierbij een rol spelen. Bij het proces van atherosclerose zijn vele factoren betrokken. Een factor is het ontsporen van normale ontstekings- en stollingsreacties die optreden tijdens activatie van de vaatwand. De endotheelcellen, die als binnenbekleding van de vaatwand een actieve barrière vormen tussen het bloed en de omringende weefsels, zijn nauw betrokken bij deze processen. Een breed scala aan stimulantia kan de endotheelcellen activeren, hetgeen o.a. kan leiden tot een verhoogde adherentie (hechting) van leukocyten en monocytten en transport van cellen over de vaatwand.

Elke modificatie die de normale reactiviteit van endotheelcellen verandert, kan bovengenoemde processen beïnvloeden. Voedingsvetten die de vetzuursamenstelling van bloedcellen en vaatwandcellen beïnvloeden, zouden hierbij een rol kunnen spelen. In dit verband waren wij geïnteresseerd of er een relatie bestaat tussen de reactiviteit van endotheelcellen en de vetzuursamenstelling van de celmembranen. Aangezien het zeer moeilijk is om endotheelcellen in vivo te bestuderen, werd een in vitro methode ontwikkeld waarmee de vetzuursamenstelling van gekweekte endotheelcellen op reproduceerbare wijze kan worden veranderd. Met behulp van deze methode werden de effecten van vetzuurmodificatie op verschillende functionele activiteiten van endotheelcellen bestudeerd, die van belang kunnen zijn in het atherosclerotisch proces.

Verschillende methoden werden ontwikkeld om de vetzuursamenstelling van endotheelcellen in vitro te modificeren (hoofdstuk 2). Endotheelcellen werden geïsoleerd uit menselijke navelstrengen en ongeveer 7 dagen gekweekt in verschillende vetzuur-gemodificeerde media. De meest geschikte methode was het langdurig kweken van endotheelcellen in aanwezigheid van menselijk serum, waaraan 200  $\mu\text{M}$  van een verzadigd, mono-onverzadigd of poly-onverzadigd vetzuur was

toegevoegd. Deze methode werd verder onderzocht op het nivo van de individuele fosfolipide klassen in de celmembraan (hoofdstuk 3). Vetzuurmodificatie veroorzaakte in iedere fosfolipide klasse een verhoging van het toegevoegde vetzuur (en elongatieproducten). In tegenstelling tot de vaak gebruikte korte vetzuurincubatie, werd deze verhoging tijdens onze langdurige vetzuurmodificatie telkens gecompenseerd door veranderingen in de concentraties van andere vetzuren in de fosfolipiden, waarbij geen veranderingen plaatsvonden in de fosfolipiden-, cholesterol- en eiwitconcentraties. Een langdurige modificatie van endotheelcellen met een verzadigd vetzuur veroorzaakte niet alleen een verhoging van dat vetzuur, maar ook een verhoging van arachidonzuur (het poly-onverzadigd vetzuur 20:4(n-6)) in de membraanfosfolipiden. Dit alles wijst op een subtiele regulatie van de onverzadigingsgraad van de endotheelcelmembraan, ongeacht grote veranderingen in vetzuursamenstelling.

Tijdens celactivatie wordt door de endotheelcel o.a. uit het arachidonzuur in de membraanfosfolipiden verschillende bioactieve mediators (intracellulaire 'communicatie' molekulen) geproduceerd. De invloed van vetzuurmodificatie op de incorporatie, distributie en modificatie van arachidonzuur in iedere fosfolipide klasse werd bestudeerd met behulp van radioactief gemerkt arachidonzuur (hoofdstuk 3). Het bleek dat alle vetzuur-gemodificeerde cellen de hoeveelheid arachidonzuur in de membraanfosfolipiden efficiënt reguleerden, o.a. door 'opslag' van een overmaat aan arachidonzuur in de triglyceriden en door elongatie. Bovendien bleek dat, tijdens kweekcondities met een relatief lage hoeveelheid arachidonzuur, de cellen een kritisch arachidonzuurnivo handhaafden in fosfatidylinositol, ongeacht de vetzuurveranderingen in de andere fosfolipide klassen.

Vervolgens werden de effecten van langdurige vetzuurmodificatie op verschillende functionele activiteiten van endotheelcellen bestudeerd. De resultaten wijzen er op dat vetzuurmodificatie geen effect heeft op de reactiviteit van endotheelcellen indien vetzuren alleen bijdragen tot de vorming van een geschikte micro-omgeving waarin membraan-geassocieerde processen plaatsvinden, maar zelf niet actief deelnemen aan deze processen. Er werden geen effecten van vetzuurmodificatie gevonden op verschillende algemene ontstekings- en stollingsreacties, zoals 1: de hechting van leukocyten en monoccyten aan endotheelcellen, 2: de stolactiviteit van endotheelcellen (versnelling van de fibrinevorming in plasma) (hoofdstuk 2), 3: de door waterstofperoxide geïnduceerde DNA schade (hoofdstuk 7), en 4: de afsnoering van stolactieve microvesikels door complement-geactiveerde endotheelcellen (gemeten als prothrombinase activiteit; de inductie van een katalytisch membraanoppervlak dat thrombinevorming stimuleert) (hoofdstuk 4). Dit wijst er op dat de eerder gevonden subtiele regulatie van de onverzadigingsgraad van de membraan in vetzuurgemodificeerde endotheelcellen als het ware een

'homeostase' handhaaft op het nivo van de endotheelcelreactiviteit, waarbij de cel normaal blijft functioneren.

Een effect van vetzuurmodificatie op de endotheelcelreactiviteit is daarentegen wel gevonden in die gevallen waarin vetzuren, naast een passieve rol bij de vorming van een geschikte micro-omgeving voor membraan-geassocieerde processen, ook zelf actief deelnemen aan deze processen. Waar bij celactivatie membraanvetzuren worden gebruikt als substraat voor bioactieve mediators, bleek dat de productie van eicosanoiden (intracellulaire 'communicatie' molekulen) in endotheelcellen werd beïnvloed door de vetzuursamenstelling van de membraan. Er werd aangetoond dat de productie van eicosanoiden verlaagd was in cellen met een lage hoeveelheid arachidonzuur in de membraan, als gevolg van modificatie met eicosapentaenzuur verrijkt medium (het poly-onverzadigd visolie-vetzuur 20:5(n-3)) (hoofdstuk 2). Waar membraanvetzuren worden aangevallen en geperoxideerd door (tijdens celactivatie gevormde) reactieve zuurstof intermediaren, bleek dat de gevoeligheid voor peroxidatie van fosfolipiden, die uit endotheelcellen zijn geïsoleerd, werd beïnvloed door de vetzuursamenstelling (hoofdstuk 6). De gevoeligheid voor peroxidatie van een individueel poly-onverzadigd vetzuur bleek evenredig te zijn met het aantal dubbele bindingen in dat vetzuurmolekuul. Tevens werd een relatie gevonden tussen de hoeveelheid geconjugeerde diënen (peroxidatieproducten) en de totale hoeveelheid poly-onverzadigde vetzuren in geïsoleerde endotheelcelfosfolipiden. Er was echter geen eenduidige relatie tussen geconjugeerde diënen en de onverzadigingsindex van deze fosfolipiden (een maat voor het gemiddeld aantal dubbele bindingen in de fosfolipiden) (hoofdstuk 6).

Een indirecte deelname van vetzuren aan membraan-geassocieerde processen zou kunnen worden afgeleid uit de gestimuleerde secretie van von Willebrand Factor uit endotheelcellen. Een specifieke verhoging van de gestimuleerde von Willebrand Factor secretie werd aangetoond in met arachidonzuur gemodificeerde endotheelcellen (hoofdstuk 4). Aangezien de invloed van arachidonzuur op de activiteit van proteïnekinase C en/of de productie van eicosanoiden niet kan worden uitgesloten, zal het mechanisme en de functie van dit fenomeen verder onderzocht moeten worden.

Samenvattend werd aangetoond dat relatief grote modificaties van de vetzuursamenstelling in gekweekte endotheelcellen kunnen worden geïnduceerd, zonder de groeikarakteristieken en vitaliteit van de cellen te beïnvloeden. Globaal gezien blijft het effect van langdurige vetzuurmodificatie beperkt door een 'homeostatische' regulatie van fysisch-chemische eigenschappen van de membraan, waardoor de cel normaal blijft functioneren. Anderzijds blijkt de endotheelcelreactiviteit wel beïnvloed te worden door de vetzuursamenstelling van de membraan, in die gevallen waarin vetzuren actief deelnemen aan membraan-geassocieerde processen tijdens celactivatie.